BULLETIN DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
2e Série — Tome 40 — N° 3. 1968, pp. 527-531.

MICRODOSAGE DU CALCIUM DANS L'HÉMOLYMPHE DU SCORPION ANDROCTONUS AUSTRALIS *(L.)*

Par M. GOYFFON et J. M. RIDET

Introduction.

Dans le cadre de l'étude générale des réactions des Arachnides aux agressions par les radiations ionisantes (**9**, **11**) nous avons étudié, à titre d'élément de référence, le taux du calcium dans l'hémolymphe du Scorpion *Androctonus australis* (L.).

Les méthodes colorimétriques ou titrimétriques de dosage du calcium sont très nombreuses. La difficulté de saisir le virage d'un indicateur coloré en microtitrimétrie nous a incités à rechercher de préférence une micro-méthode colorimétrique. En particulier, l'acide chloranilique se combine avec le calcium pour donner du chloranilate de calcium insoluble. Ce précipité est traité par l'EDTA sodique qui complexe le calcium et libère ainsi l'acide chloranilique de couleur violette. Cette coloration, très stable, peut être utilisée pour un dosage spectrophotométrique, à 520 mμ. C'est cette technique que nous avons employée, adaptée en ultramicrométhode (**10**, **12**) sur une prise d'essai de 40 μl d'hémolymphe. Il faut noter que cette méthode ne doit pas être utilisée dans le cas d'un prélèvement sur fluorure de sodium.

Matériel — méthodes.

1. — Le dosage a été effectué chez 69 sujets, 35 mâles et 34 femelles d'un poids variant de 2,44 g à 12,10 g, régulièrement alimentés avec des vers de farine (*Tenebrio molitor*), et placés dans des conditions d'élevage identiques. L'hémolymphe est prélevée par ponction dorsale entre les 5e et 6e segments, et centrifugée 5 mn à 10 000 tours/mn. Le dosage suit immédiatement le prélèvement.

2. — *Pratique du dosage :*

a) *principe :* le calcium est précipité par l'acide chloranilique. Après lavage à l'aclool isopropylique, le chloranilate de calcium est dissous dans une solution de sel sodique de l'EDTA. Le calcium est bloqué à l'état de complexe par l'EDTA, ce qui libère le chloranilate de sodium coloré en rose violet. La coloration est stable et se prête à un dosage colorimétrique.

b) *réactifs :*

R I : solution d'acide chloranilique prête à l'emploi (Biolyon).
R II : solution d'EDTA sodique, prête à l'emploi (Biolyon).
R III : alcool isopropylique à 50 %.

R IV : solution étalon de calcium à 300 mg/litre : faire dissoudre 0,7491 g de CO_3 Ca p.p.a. dans 27 ml de ClH N. Compléter à 1 l avec de l'eau distillée. Conserver au frais, en flacon bouché à l'émeri.

c) *technique :* dans un tube en polypropylène de 550 µl mettre 40 µl d'hémolymphe, et 40 µl de R I. Agiter, et laisser reposer 30 mn au moins. Centrifuger 5 mn à vitesse élevée.

Éliminer le surnageant avec du papier filtre en respectant le culot. Remettre alors le culot en suspension dans 200 µl de R III. Agiter et centrifuger comme plus haut.

Éliminer le surnageant en retournant le tube sur un papier filtre. Essuyer l'intérieur du tube au papier filtre, en respectant toujours le culot. Reprendre alors le culot par 150 µl de R II. Agiter et apprécier l'intensité de la coloration au spectrophotomètre, à 520 mµ, contre un blanc constitué par R II. On peut déduire le taux de calcium de la densité optique obtenue à partir de la solution étalon, ou reporter la densité optique obtenue sur une courbe, qui est une droite pour les taux compris entre 40 mg/l et 500 mg/l. On peut utiliser aussi un sérum-étalon.

Résultats.

Les résultats sont donnés dans le tableau suivant. En même temps, un dosage de protéines a été fait, par la méthode du biuret.

N°	Sexe	Poids (g)	Ca (mg/l)	Protéines (g/l)	N°	Sexe	Poids (g)	Ca (mg/l)	Protéines (g/l)
1	F		294		26	M	5,57	285	98,2
2	F		260		27	M	6,24	296	71,2
3	M	4,93	262	50,0	28	M	7,83	253	74,2
4	M	3,04	357	82,8	29	F	3,27	150	67,0
5	F	3,38	305	88,1	30	F	4,12	309	71,0
6	F	4,13	270	74,3	31	M	7,21	325	74,0
7	M	5,77	192	62,5	32	M	6,06	325	59,7
8	F	6,65	245	90,0	33	M	6,01	309	80,0
9	M	5,01	271	75,6	34	F	5,25	225	77,0
10	F	7,27	278	81,2	35	M	4,73	300	69,7
11	F	5,96	305	102,5	36	F	7,47	324	78,5
12	M	5,51	250	43,3	37	F	12,10	356	81,4
13	M	6,80	245	76,5	38	M	5,35	285	82,7
14	M	5,18	269	88,1	39	F	4,95	324	56,6
15	M	4,98	274	75,0	40	M	4,49	356	79,5
16	F	9,10	202	42,1	41	M	3,89	370	96,5
17	F	6,70	365	70,3	42	M	3,02	300	76,6
18	M	8,35	303	68,7	43	F	5,31	300	88,0
19	M	6,82	246	74,4	44	F	5,84	308	77,3
20	F	5,86	278	70,0	45	F	4,18	245	53,6
21	M	8,02	324	66,7	46	F	6,11	311	65,5
22	M	5,66	296	88,1	47	F	5,55	302	74,4
23	M	4,95	283	62,5	48	F	6,84	310	65,5
24	M	5,67	286	76,7	49	F	9,09	308	68,2
25	F	7,62	254	70,0	50	M	5,56	308	82,4

N°	Sexe	Poids (g)	Ca (mg/l)	Protéines (g/l)	N°	Sexe	Poids (g)	Ca (mg/l)	Protéines (g/l)
51	F	3,49	260	66,7	62	F	6,56	306	84,2
52	M	5,40	302	71,0	63	F	7,69	323	82,9
53	M	5,26	294	55,4	64	F	4,36	361	81,4
54	M	3,96	435	102,2	65	F	6,88	340	91,5
55	F	7,10	309	59,7	66	M	4,39	356	86,5
56	M	4,99	332	71,0	67	F	2,44	285	79,6
57	F	4,82	269	55,4	68	M	4,03	340	88,1
58	M	5,34	333	56,8	69	M	6,89	420	89,9
59	M	5,81	269	96,6					
60	F	7,78	322	68,2					
61	F	7,30	356	65,3	MOYENNE :			298 ± 45 mg/l	75,3 ± 13,2g/l

COMMENTAIRES.

1. — *Choix du dosage :* la technique à l'acide chloranilique selon FERRO et BELL (**2**, **3**) est facile à adapter en ultramicrométhode. Un contrôle de sa reproductibilité dans ces conditions a été effectué, en répétant le dosage sur une solution étalon à 300 mg/l. Pour une série de 16 dosages, les résultats ont été les suivants : 293 — 300 — 293 — 293 — 293 — 300 — 300 — 300 — 293 — 300 — 293 — 300 — 302 — 296 — 293 — 293 mg/l, ce qui donne :

Moyenne m = 296 ± 3,5 mg/l.

soit un coefficient de variation $Cv = \frac{s}{m} \times 100 = \frac{3,5}{296} = 1,1\ \%$.

et une incertitude relative $Er = \frac{4,5}{293} = 1,5\ \%$.

Toutefois, cette reproductibilité et cette précision sont liées à l'emploi régulier des mêmes micropipettes pour le prélèvement de l'hémolymphe (40 µl) d'une part, et l'addition des réactifs d'autre part.

2. — *La teneur moyenne* en calcium de l'hémolymphe du Scorpion *Androctonus australis* est de 298 ± 45 mg/l. L'étude des paramètres classiques et des écarts permet d'assimiler la distribution à une distribution normale (Cf. fig. 1). Les valeurs moyennes du taux de calcium sont de 304 ± 47 mg/l chez le mâle, 292 ± 45 mg/l chez la femelle, mais cette différence n'est pas significative. On remarquera la grande dispersion des valeurs, comme pour la protidémie et la glycémie.

Chez d'autres espèces de Scorpions, comme *Heterometrus swammerdami* (**6**) ou *Heterometrus fulvipes* (**7**) la teneur en calcium est du même ordre de grandeur, et de même chez de nombreux Insectes (**1, 13**).

3. — Chez *Heterometrus fulvipes* et *Heterometrus swammerdami*, une corrélation positive a été notée entre taille et calcémie, pour les femelles seulement. Chez *A. australis*, il n'y a pas de telle corrélation, ni chez le mâle, ni chez la femelle.

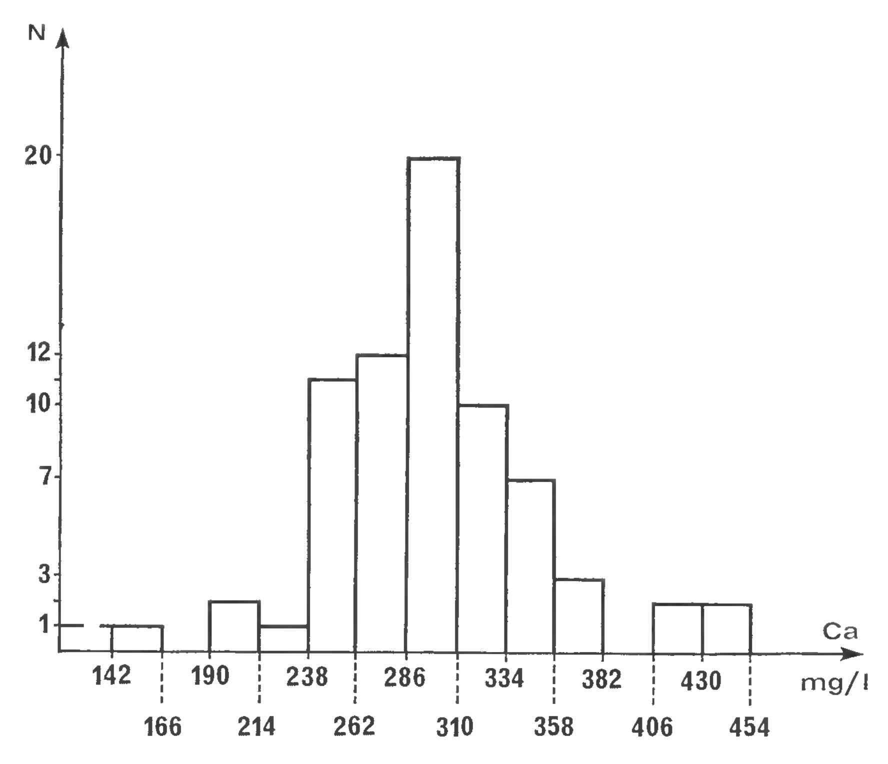


FIG. 1 Histogramme des calcémies chez *A. Australis.*

4. — Entre calcémie et protidémie, chez *A. australis*, on obtient, à partir de 67 couples de dosages (cf. tableau) un coefficient de corrélation r = 0,41. Pour n = 67 déterminations, le coefficient de corrélation est hautement significatif pour les valeurs de r ⩾ 0,32 (**4**). Un test t pratiqué suivant la formule $t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$ (**5**) conduit à une valeur de t = 11,5, et la probabilité d'avoir un tel résultat par un échantillonnage au hasard dans une population sans corrélation est extrêmement faible. Ce coefficient reste cependant peu élevé ; il y a corrélation positive lâche, entre protidémie et calcémie. Ceci peut être interprété comme l'indice de la liaison d'une fraction variable du calcium dosé avec les protéines de l'hémolymphe. On peut essayer de préciser la nature de cette corrélation, par analogie avec les observations réalisées sur *Homarus americanus* (**8**) où l'hémocyanine apparaît comme constituée de douze sous-unités qui se dissocient lorsqu'on élimine le calcium par dialyse. Ainsi peut-on supposer que, chez *A. australis*, l'hémocyanine est également un polymère, à degré de polymérisation variable : le calcium, nécessaire à cette polymérisation, serait d'autant plus lié, statistiquement, à l'hémocyanine (donc aux protéines) que le degré de polymérisation serait plus élevé. Cette hypothèse rendrait compte, en même temps, des aspects d'hétérogénéité qu'on peut observer sur les électrophorégrammes des protéines de l'hémolymphe.

Conclusion.

L'hémolymphe du Scorpion *A. australis* contient du calcium au taux de 298 $\pm$ 45 mg/l, identique chez les deux sexes. Il y a une corrélation positive lâche entre calcémie et protidémie.

Laboratoire d'Études Radiobiologiques des Animaux Irradiés, Muséum National d'Histoire Naturelle Division de Biologie Générale et Écologie, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Centre d'Études des Zones Arides, Centre National de la Recherche Scientifique.

Remerciements : nous remercions vivement le Dr. Irunberry (Institut Pasteur d'Alger) qui nous approvisionne régulièrement en scorpions.

BIBLIOGRAPHIE

1. Chauvin R. — Physiologie de l'Insecte. I.N.R.A. Ed. Paris, 1956.
2. Ferro P. V., et Bell A. — A simple method for the determination of Ca. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1957, **28**, nº 2, pp. 208-217.
3. Ferro P. V. et Ham A. B. — A simple spectrophotometric method for the determination of Ca. II. A semi-micromethod with reduced precipitation time. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1957, **28**, nº 6, pp. 689-693.
4. Lamotte M. — Initiation aux méthodes statistiques en biologie. Masson Ed. Paris, 1962, p. 134.
5. Mather K. — Analyse statistique et biologie. Gauthier-Villars Ed. Paris, 1965, p. 203.
6. Padmanabhanaidu B. — Ionic composition of the blood of scorpion. I. Some organic and inorganic constituents of the blood. *Curr. Sc.*, 1962, **31**, p. 21.
7. Padmanabhanaidu B. — Ionic composition of the blood and the blood volume of the scorpion Heterometrus fulvipes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1966, **17**, pp. 157-166.
8. Pickett S. M., Riggs A. F. et Larimer J. L. — Lobster Hemocyanin : properties of the minimum functional subunit and of aggregates. *Science-U.S.A.*, 1966, **151**, 3713, pp. 1005-1007.
9. Rodier J., Veillard J. M., Grenot C, Blanc P. et Niaussat P. — Modifications comparées des éléments figurés de l'hémolymphe du Scorpion *Androctonus australis* (L.) soumis soit à des agressions d'ambiance, soit à une irradiation expérimentale. *Bull. Mus. Nat. Hist. Nat. Fr.*, 1967, **39**, nº 1, pp. 197-204.
10. Spandrio L. — A spectrophotometric micromethod for calcium determination in blood serum. *Clin. Chim. Acta*, 1965, **12**, pp. 703-704.
11. Vachon M., Niaussat P, Ebersole J. M. et Grenot C. — Sur la radiosensibilité comparée, vis-à-vis des rayonnements gamma, de quelques espèces de Scorpions. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 1964, **259**, pp. 3389-3391.
12. Webster W W. Jr. — A simple microspectrophotometric method for the determination of serum calcium. *Amer. J. Clin. pathol.*, 1962, **37**, nº 3, pp. 330-333.
13. Wigglesworth V. B. — The principle of Insect physiology. Methuen and Co. Ed. Londres, 1965.